



## Przeciwciała i nośniki leków w terapii celowanej – postęp i ograniczenia

Leszek Konieczny, Barbara Piekarska, Irena Roterman,  
Janina Rybarska, Barbara Stopa, Grzegorz Zemanek

Instytut Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

### Antibodies and drug-carriers in targeted therapy – progress and limitations

#### Summary

The paper addresses to problems of carriers and antibodies in targeted therapy. Also the new material of liquid crystalline nature, designed for use as a drug vehicle in the immune targeting technique is presented and its property is discussed. Obtained by self-assembling, the ribbon-like supramolecular organisation products of some azo-dyes, particularly including Congo red and Evans blue, form micellar bodies of this carrier. They bind spontaneously and selectively to immune complexes but not to free antibodies. The binding strongly enhances the antigen – antibody interaction. Micelles of the carrier composed of self-assembled molecules easily incorporate many foreign substances including drugs, favouring however those of possibly planar molecules. The excess of carrier leaves the organism rapidly through the urine tract, reducing the possible side effects. The nature of chromonic liquid crystalline material is suitable for many modifications and adapting elaboration.

#### Key words:

immunotargeting, carriers of antibodies and drugs, chromonic liquid crystals, Congo red.

#### Adres do korespondencji

Leszek Konieczny,  
Instytut Biochemii  
Lekarskiej,  
Collegium Medicum,  
Uniwersytet Jagielloński,  
ul. Kopernika 7,  
31-034 Kraków.

### 1. Wstęp

Efektywność farmakoterapii zależy w sposób istotny od lokalnego stężenia leku i długości czasu kontaktu z obiektem docelowym. Ogólne, niespecyficzne działanie farmakoterapeutycz-

ne staje się niebezpieczne, jeżeli stosowany lek jest toksyczny. Problem ten dotyczy szczególnie terapii antynowotworowej.

Oczywiste jest zatem poszukiwanie sposobów selektywnego działania na komórkę docelową poprzez aktywację procesów efektorowych układu odporności lub toksyczne działanie miejscowe. Selektywne gromadzenie leku na wybranych komórkach stwarza możliwość podwyższonej skuteczności działania przy zredukowanych niekorzystnych efektach ubocznych. Podstawowym warunkiem ukierunkowanego działania terapeutycznego jest odrębność charakterystyki komórki docelowej (nowotworowej). Może to być specyfika cech fizycznych (np. wrażliwość termiczna), wytwarzanie specyficznego dla danej komórki enzymu lub obecność determinant powierzchniowych odmiennych od innych komórek organizmu. Znane są zmiany ekspresji białek i komponent cukrowych na powierzchni komórki, powstałe w wyniku transformacji nowotworowej i złośliwienia. Nadają one komórce pewną odrębność. Niestety odrębność ta nie jest w pełni wykorzystana ani przez organizm ani przez medycynę. Podstawową przyczyną tego niepowodzenia jest bardzo duża zmienność determinant powierzchniowych, związana z nasiloną mutagennością (1-4). Również znacznie zwykle zwiększona złuszczalność struktur powierzchniowych komórki, a co za tym idzie, ich obecność w płynach ustrojowych sprzyja immunotolerancji i neutralizacji lekoterapii.

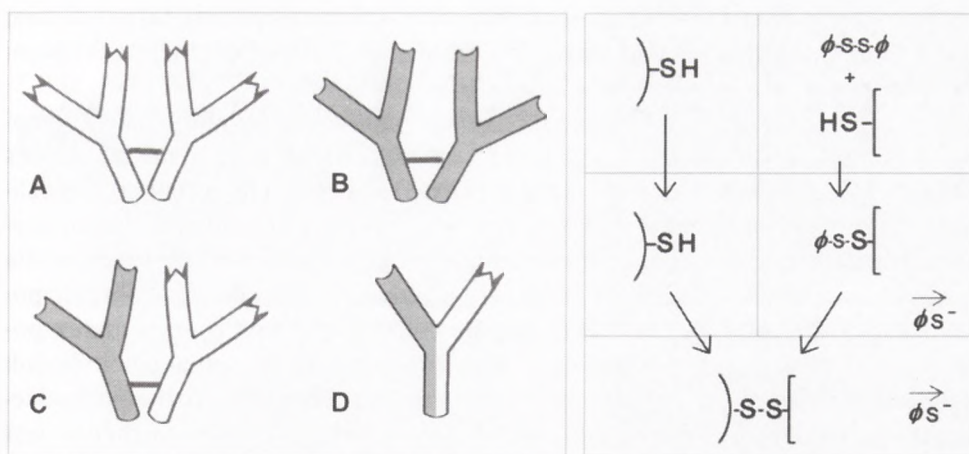
Chociaż sprawność układu odpornościowego w obronie antynowotworowej pozostawia wiele do życzenia, przekonanie o rozpoznawaniu przez układ immunologiczny elementów obcych na komórkach, które uległy transformacji nowotworowej jest jednak powszechne (5). Wiele antygenów o wysokim współczynniku specyficzności dla nowotworów jak CEA, alfafetoproteina, PSA, Her-2, determinanty antydio-typowe dla limfocytów szpiczakowych i in. zostały zidentyfikowane jednoznacznie. Istnieje zatem uzasadnienie dla poszukiwań udoskonalonego sposobu wykorzystania przeciwciał zarówno jako czynników mobilizujących naturalne mechanizmy efektorowe układu immunologicznego (forma aktywacyjna) jak i w roli wyłącznie elementów naprowadzających na cel w chemo- lub radioterapii (forma pasywna).

Proponowane rozwiązania techniczne są jednak nadal odległe od doskonałości przede wszystkim z powodu trudności wykorzystania przeciwciał ksenogenicznych oraz wad układów nośnikowych dla leków. W artykule opisano różne próby podejmowane dla ominięcia tych trudności. Jako rezultat własnych badań przedstawiono niektóre właściwości nowego układu nośnikowego o cechach ciekłokrystalicznych i możliwościach praktycznego wykorzystania.

## **2. Przeciwciała stosowane dla tłumienia proliferacji komórek lub indukcji procesów cytotoksycznych**

Trudność uzyskania przeciwciał ludzkich w ilościach terapeutycznych powoduje, że medycyna w swoich wysiłkach odwołuje się do przeciwciał ksenogenicznych,





Rys. 1. Przedstawione modelowo formy przeciwciał tworzonych sztucznie dla uzyskania zwiększonej mobilizacji zjawisk efektorowych: A i B – przeciwciała homodimeryczne; C – przeciwciało heterodimeryczne (o różnej specyficzności); D – przeciwciało chimeryczne. Po prawej stronie rysunku przedstawiono mechanizm kontrolowanego tworzenia dwusiarczków ( $\phi\text{-S-S-}\phi$  – DTNB [kwas 5.5'-ditiobis{2-nitrobenzoesowy}]).

specyficznych dla określonych determinant nowotworowych. Są to z reguły przeciwciała monoklonalne. Efektywność ich wykorzystania nie jest jednak adekwatna do oczekiwań. Ograniczenie wynika przede wszystkim z reakcji organizmu gospodarza na obce białko. Pewne utrudnienie jest też rezultatem monoklonalnej, wysoko specyficznej natury przeciwciał. Niewielka gęstość rozłożenia determinant antygenowych wiążących przeciwciała monoklonalne uniemożliwia tworzenie większych kompleksów immunologicznych zapewniających ich odpowiednio wysoką trwałość i warunkujących wyzwolenie aktywności efektorowej. Dlatego coraz częściej poszukuje się określonych zestawów przeciwciał o różnej specyficzności, tzw. „koktajli”, w miejsce stosowania przeciwciał jednospecyficznych. Uzyskania korzystnych efektów terapeutycznych oczekuje się nie tylko na drodze aktywacji mechanizmów efektorowych układu odpornościowego, ale również poprzez bezpośredni wpływ na samą komórkę nowotworową (6). Zdecydowanie większą skuteczność osiąga się jednak stosując w miejsce niezależnych przeciwciał ich sprzęgnięte pochodne, ułatwiające agregację determinant komórkowych. Stwierdzono na przykład, że agregacja niektórych receptorów powierzchniowych komórek nowotworowych, w tym CD19, C20, C21 spowodowana interakcją z przeciwciałami może doprowadzić do zatrzymania przejścia  $G_0/G_1$ , albo wręcz do wyzwolenia procesu apoptozy w komórce. Dla uzyskania tego efektu zastosowano sprzęgnięte kowalencyjnie przeciwciała o tej samej specyficzności (homodimery) (rys. 1 A, B) (7) wykazujące mimo monospecyficzności znacznie większą aktywność antynowotworową niż przeciwciała działające indywidualnie. Wzmoczoną aktywność antynowotworową uzyskuje się jednak głów-



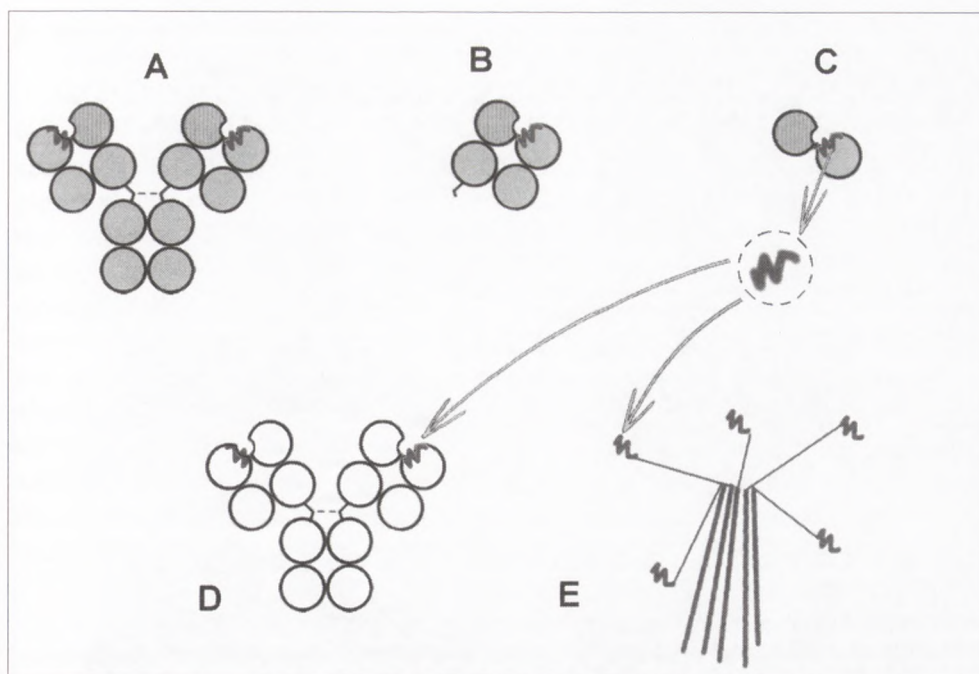
nie przez tworzenie przeciwciał heterodimerycznych (przeciwciała bispecyficzne) (rys. 1 C) (8). Można je uzyskać na drodze chemicznej lub biologicznej (technikami rekombinacyjnymi).

Bispecyficzność przeciwciał pozwala na sprzęganie różnych determinant i receptorów komórkowych, co może indukować zmianę zachowań komórki lub proces apoptozy (9). Zwiększa ona też szansę aktywacji procesów efektorowych, umożliwiając bezpośrednie łączenie komórek nowotworowych z komórkami efektorowymi układu odpornościowego. Podobną funkcję mogą spełniać również przeciwciała chimeryczne, a zatem takie, które mają zaznaczoną niejednorodność w obrębie pojedynczej cząsteczki (rys. 1 D). Przeciwciała chimeryczne tworzone są przez połączenie jednowartościowych połówek (HL) różnych cząsteczek immunoglobulin lub przez kombinację części stałych i zmiennych cząsteczki mających różne pochodzenie. Dla wydajnego tworzenia przeciwciał dimerycznych i chimer niezbędna jest kontrola procesu łączenia elementów białkowych o różnym pochodzeniu. Chemicznie jest to możliwe przez uzbrajanie łączonych ze sobą elementów białkowych w różne, ale specyficznie reagujące ugrupowania. Technikami genetycznymi można ten efekt uzyskać poprzez tworzenie wspólnego łańcucha peptydowego łączącego składowe elementy chimery. Zastosowana na początku lat osiemdziesiątych metoda kontrolowanego sprzęgania chemicznego pozwala na otrzymanie chimerycznych pochodnych IgG poprzez tworzenie wiązań dwusiarczkowych (rys. 1 – strona prawa) (10,11). Obecnie stosuje się również inne połączenia chemiczne pozwalające na kontrolowanie przebiegu procesu, ale zasada mechanizmu musi być zachowana, jeśli proces tworzenia cząsteczek chimerycznych ma być kontrolowany.

Rozwój technik inżynierii genetycznej pozwolił na uzyskiwanie wielu różnych kombinacji chimerycznych, jednak syntetyzowane białka lub ich fragmenty nadal wymagają chemicznego sprzęgania, jeżeli wyjściowo nie tworzą produktu jednołańcuchowego (9,12). Utrudnieniem na drodze niekontrolowanego procesu rekombinacji, który ma na celu uzyskanie bispecyficznych i/lub chimerycznych pochodnych, jest bowiem niejednorodny produkt końcowy powstały przez przypadkowe łączenie się bezpośrednich produktów syntezy.

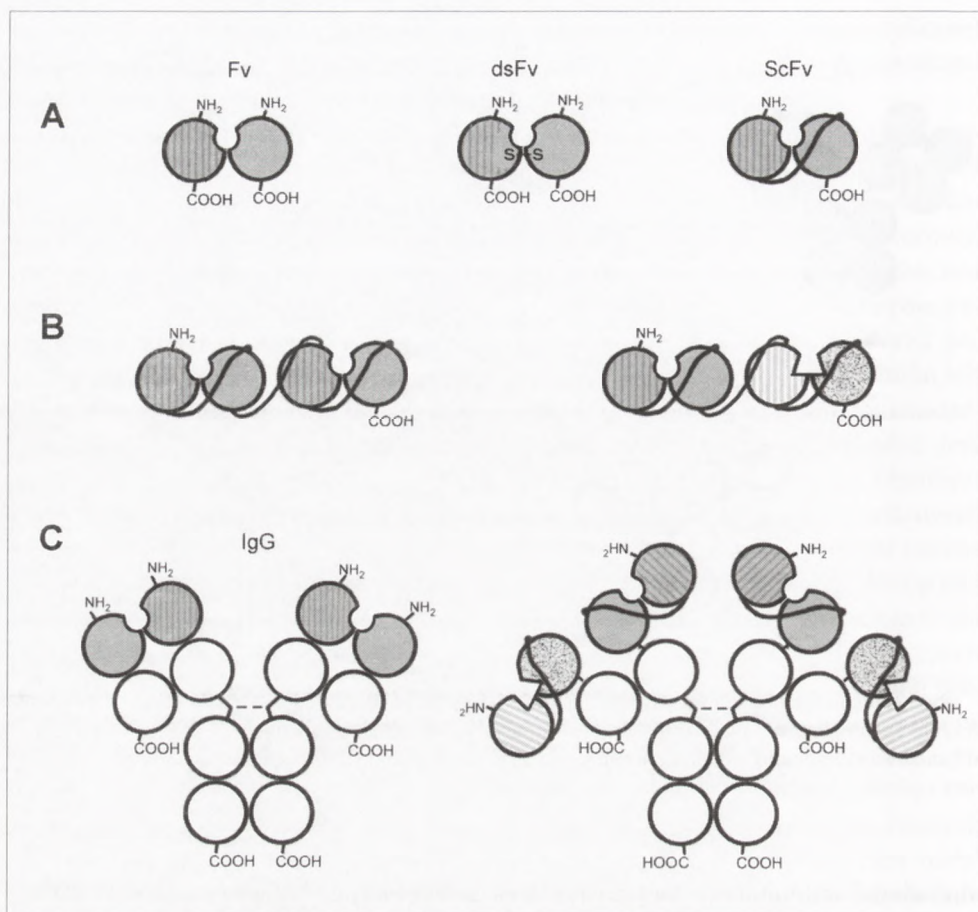
Zasadniczą barierą w stosowaniu przeciwciał ksenogenicznych, zarówno dla stymulacji naturalnej odpowiedzi immunologicznej, jak również wykorzystania cząsteczek immunoglobulin lub ich pochodnych jako nośników w terapii pasywnej jest, jak już wspomniano, reakcja układu odpornościowego gospodarza, który rozpoznaje białko obcego pochodzenia. Wynikającą stąd trudność usiłuje się ominąć przez stosowanie jak najmniejszych fragmentów immunoglobulin, zachowujących jednak nadal zdolność do reakcji z antygenem (rys. 2) (9,13-17) oraz zbliżenie sekwencji immunogennych fragmentów immunoglobuliny ksenogenicznej do sekwencji immunoglobuliny ludzkiej przez mutację kierowaną (*resurfacing*) lub implantacje fragmentów hiperzmiennych do domeny V człowieka (18-21). Wreszcie bardzo ciekawe rozwiązanie wskazuje się w badaniach, w których podejmuje się próbę zmniejszenia rozpoznania immunogennych struktur przez „kamufaż” molekularny lub tłumienie





Rys. 2. Immunoglobulina ksenogeniczna i jej reaktywne pochodne reprezentujące stopniowe ograniczenie ksenogenicznej materii białka: A – immunoglobulina ksenogeniczna; B – Fab; C – Fv; D – humanizowana immunoglobulina z ksenogenicznym fragmentem CDR w grupie czynnej; E – zmontowany techniką genetyczną pięcioramienny białkowy „uchwyt” dla peptydów CDR.

odpowiedzi immunologicznej gospodarza podobnie jak czynią to komórki nowotworowe (3,4,22). Ta niezmiernie ciekawa i obiecująca technika wymaga jednak dalszych badań zanim osiągnie niezbędną skuteczność. Spośród rozważanych, możliwych sposobów zmniejszenia immunogenności ksenogenicznych przeciwciał na obecnym etapie badań najczęściej wykorzystuje się jednak ograniczanie obcego materiału białkowego do niezbędnych jedynie fragmentów reagujących z antygenem i odrzucanie pozostałych części cząsteczki, a przede wszystkim fragmentu Fc. Fragmenty Fab i  $(\text{Fab})_2$  można uzyskać wprowadzając na drodze proteolizy, jednak tradycyjne metody chemiczne zastępowane są coraz częściej technikami inżynierii genetycznej. Poprzez rekombinację DNA możliwe staje się nawet tworzenie fragmentów białkowych reagujących specyficznie z antygenem, a złożonych wyłącznie z części zmiennych immunoglobulin tzw. Fv (rys. 2 C, 3 A, 3 B). Pochodne te nie mogą wprowadzić wyzwoleń efektorowej, natomiast mogą modyfikować funkcje komórek poprzez sprzęganie receptorów komórkowych. Mogą też być wykorzystane jako elementy naprowadzające w pasywnej terapii celowanej. Dla odzyskania zdolności inicjowania procesów efektorowych można je sprzęgać z częścią stałą pochodzącą z ludzkiej immunoglobuliny (rys. 3 C) (15).



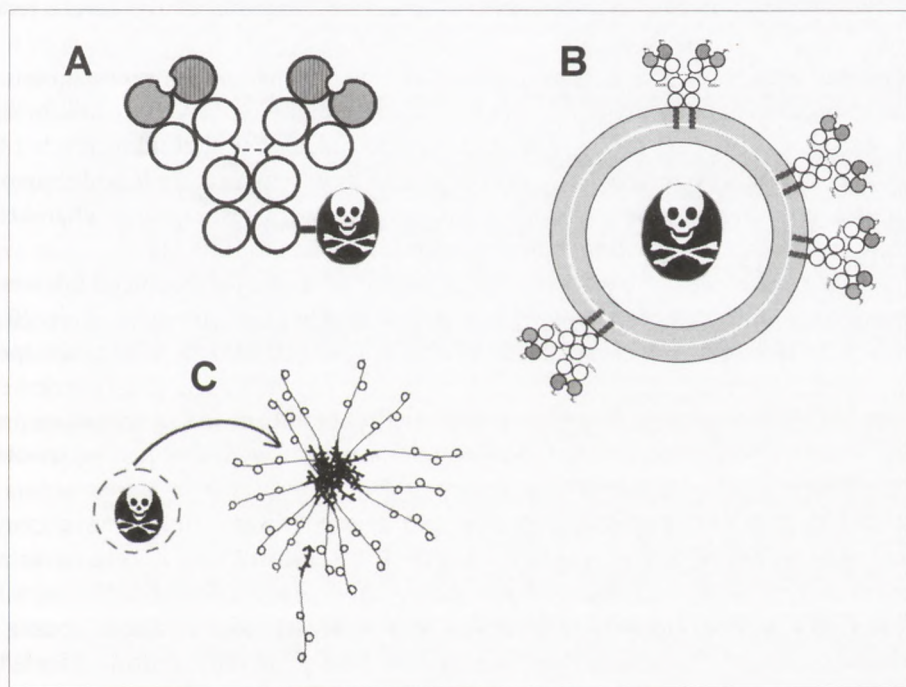
Rys. 3. Mono-, dwu- i wielowartościowe pochodne immunoglobulin ksenogenicznych tworzone dla celów terapii: A – monowartościowe fragmenty Fv immunoglobuliny ksenogenicznej; B – dwuwartościowe pochodne homo- i heterospecyficzne; C – humanizowane przeciwciała homo- i heterospecyficzne.

Metody rekombinacji pozwalają na dalsze ograniczenie materiału białkowego obcego pochodzenia aż do peptydu, stanowiącego jedynie fragment grupy czynnej, z zachowaniem jednak specyficzności wobec antygeny, tzw. CDR, który zostaje wbudowany do domeny zmiennej immunoglobuliny ludzkiej (rys. 2 D) (19,21,23). Podejmuje się również próby montażu wielowartościowych cząsteczek pochodzenia nie immunoglobulinowego, uzbrojonych w peptydy CDR, które dzięki wielowartościowości cząsteczki mogą tworzyć stabilne kompleksy pomimo ograniczonej powierzchni specyficznego kontaktu (rys. 2 E) (24). Struktury takie mogą mieć duże znaczenie, jeśli całość (poza peptydami CDR) uda się wytworzyć z materiału białkowego pochodzącego od człowieka.



### 3. Przeciwciała i nośniki w celowanej terapii pasywnej

Drugą, może nawet bardziej budzącą nadzieję formą wykorzystania przeciwciał w celach leczniczych jest terapia pasywna, tj. taka, w której przeciwciała są jedynie specyficznymi nośnikami leku, a nie induktorami naturalnej odpowiedzi immunologicznej. Oczekiwania dotyczą głównie możliwości stosowania metod celowanej chemo- lub radioterapii (25), którym ukierunkowanie nadają przeciwciała. W technice tej przeciwciała mogą służyć jako bezpośredni nośnik leku (rys. 4 A) (26) lub funkcjonować jako element nakierowujący dla innego niespecyficznego nośnika. Nośnikiem najbardziej zaawansowanym w badaniach są liposomy. Są to tworzone sztucznie małe kuliste pęcherzyki, w których płynna zawartość ograniczona jest błoną zbudowaną z fosfolipidów (rys. 4 B) (27-29). Ukierunkowanie transportu jest możliwe dzięki zakotwiczeniu w błonie przeciwciałom lub ich fragmentom. Możliwość zakotwiczenia uzyskuje się przez chemiczne przyłączenie niepolarnego fragmentu do cząsteczek specyficznych przeciwciał. Rozmiary liposomów wahają się w granicach 0,05-5 nm. Można je zatem potraktować jako opakowanie dla transportowane-



Rys. 4. Nośniki stosowane w docelowym transporcie leków: A – humanizowana immunoglobulina; B – uzbrojony w przeciwciała liposom (immunoliposom); C – micela wytworzona przez asocjację syntetycznych łańcuchów polimerycznych o strukturze amfifilowej (złożonych z fragmentów hydrofilowych i hydrofobowych).

go leku. Istotną zaletą liposomów jest duża wydajność transportu umożliwiającą koncentrację leku na obiekcie docelowym.

Pomimo zalet, zastosowanie liposomów w praktyce jest nadal ograniczone do prób. Istotną barierą w szerszym zastosowaniu liposomów jest niestabilność tych struktur. Ma ona podłoże zarówno fizyczne jak i biologiczne. Błona fosfolipidowa jest strukturą półpłynną o gęstości zbliżonej w temperaturze ciała do gęstości roztopionej smoly. Ograniczenie wynika z małej odporności mechanicznej tej błony, nie mającej w przeciwieństwie do błony komórkowej odpowiedniej stabilizacji przez białka (np. typu spektryny) i kontaktu z cytoszkieletem. Problem stanowi zatem nie tylko trwałość po wprowadzeniu do organizmu, ale również przechowywanie, a przede wszystkim sterylizacja. Istotną przeszkodą w stosowaniu liposomów jest też czynnik biologiczny związany w wychwytem liposomów przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego. Dotyczy to szczególnie liposomów o większym promieniu (27).

W związku z tymi utrudnieniami podejmuje się wiele wysiłków mających na celu zwiększenie trwałości błon liposomalnych i zmniejszenie ich rozpoznawalności przez komórki żerne. Stabilność błon można zwiększyć podobnie jak czynią to komórki, przez wprowadzenie cholesterolu, dołączenie odpowiednich białek lub ewentualnie syntetycznych polimerów. Niestety zwiększenie trwałości miceli ogranicza jednocześnie uwalnianie i wykorzystanie transportowanego leku.

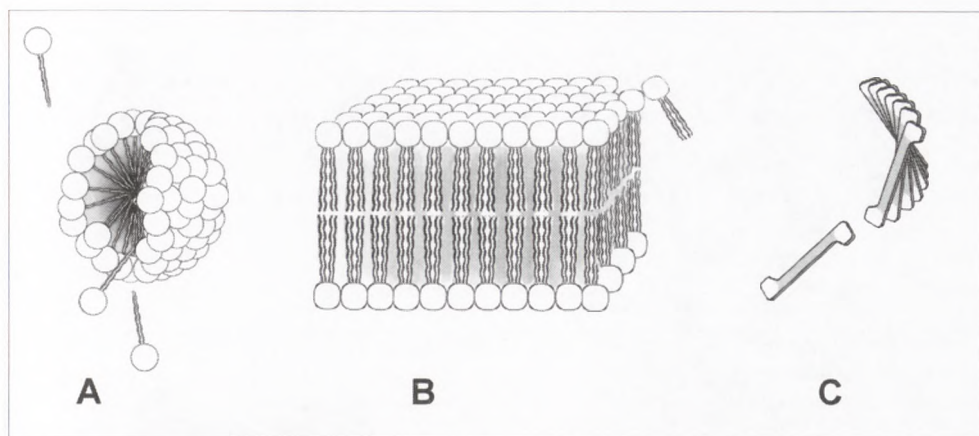
Pomimo tych trudności, z liposomami wiąże się nadzieje na ich szersze zastosowanie. Oprócz wysiłków mających na celu udoskonalenie typowych nośników liposomalnych podejmuje się próby tworzenia struktur micelarnych, zbudowanych z łańcuchów polimerycznych o cechach związków amfifilowych, a zatem o podobnym do fosfolipidów strategicznym rozkładzie polarności, który jest ogólnie charakterystyczny dla związków powierzchniowo czynnych (rys. 4 C) (30,31).

Transportowane leki można rozpuszczać w niepolarnym jądrze miceli lub wiązać bezpośrednio do fragmentów polarnych. Opisane micle tego typu mają około 20 nm średnicy. Rozmiarami odpowiadają dość dużemu białku. Można je uczynić specyficznymi przez przyłączenie przeciwciał. W związku z wielkością cząsteczek i charakterystyką chemiczną ani liposomy ani micle polimeryczne nie są wydalone przez nerki. Nadmiar podanego leku pozostaje w organizmie i wydalany jest po uwolnieniu z miceli.

Nowy kierunek poszukiwań związany jest ze strukturami ciekłokrystalicznymi tworzącymi taśmowe zgrupowania micelarne (32-34). Struktury micelarne w rozтворach mydeł jak również błony komórkowe zbudowane z fosfolipidów są także zaliczane do układów ciekłokrystalicznych. Jednak właściwości narzucone przez ich struktury supramolekularne są istotnie różne od tych, jakie reprezentują micle taśmowe.

Struktury micelarne tworzone przez cząsteczki fosfolipidów, które mają we fragmencie polarnym zarówno ugrupowania o ładunku ujemnym (reszta kwasu fosforowego) jak i dodatnim (cholina) nie ulegają istotnym odpychaniom przy asocjacji

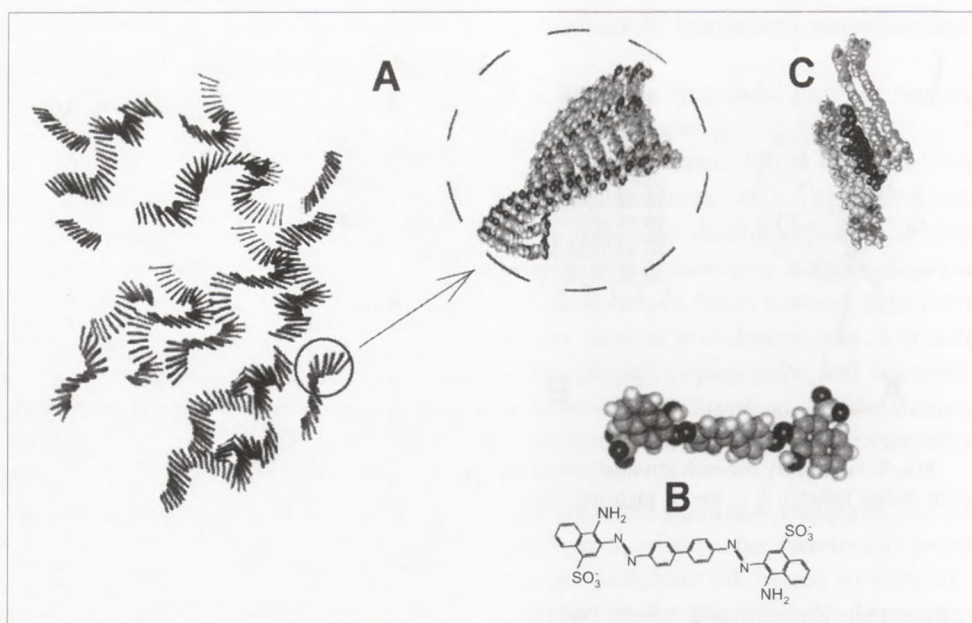




Rys. 5. Fragmenty różnych struktur micelarnych przedstawione w układzie modelowym: A – fragment miceli kulistej; B – miceli płytowej (błona fosfolipidowa); C – miceli taśmowej.

cząsteczek. Umożliwiają zatem tworzenie miceli płytowych, co jest warunkiem powstawania błon. Siły odpychające przy jednoimiennie naładowanych grupach polarnych wymuszają powstawanie raczej miceli kulistych. Zarówno płyty jak i micelle kuliste mają powierzchnię polarną, podczas gdy fragmenty hydrofobowe zostają schowane do wnętrza (rys. 5 A i B). Zasocjowane i ułożone w formie taśmy, symetryczne cząsteczki związków należących do chromonicznych układów ciekłokrystalicznych, z ugrupowaniami ładunkowymi rozmieszczonymi biegunowo, nie mogą schować całkowicie wewnątrz miceli swoich fragmentów hydrofobowych. W rezultacie środkowe pasmo taśmy o charakterze niepolarnym pozostaje w kontakcie ze środowiskiem (rys. 5 C). Stąd wynika zdolność do adhezji, której nie wykazują micelarne struktury kuliste i płytowe, a która jest przyczyną specyficznej reaktywności miceli taśmowych, umożliwiającej m.in. tworzenie kompleksów z immunoglobulinami. Jeżeli cząsteczki monomerów są wydłużone i sztywne, a ponadto zbudowane z pierścieni aromatycznych, które w centralnej części cząsteczki nie mają ugrupowań ładunkowych, to asocjując układają się jak kostki domina (rys. 6 A). Przylegają one do siebie płaszczyznami pierścieni, oddziałując dzięki prostokątnemu względem płaszczyzny ustawieniu orbitali  $\pi$  (34-36). Do grupy związków, które tworzą micelle taśmowe należą barwniki bisazowe, znane od dawna jako tzw. barwniki bezpośrednie, stosowane do barwienia celulozy, a także wielu białek amyloidowych. Typowymi przedstawicielami tej grupy są czerwień Kongo i błękit Evansa (rys. 6 B).

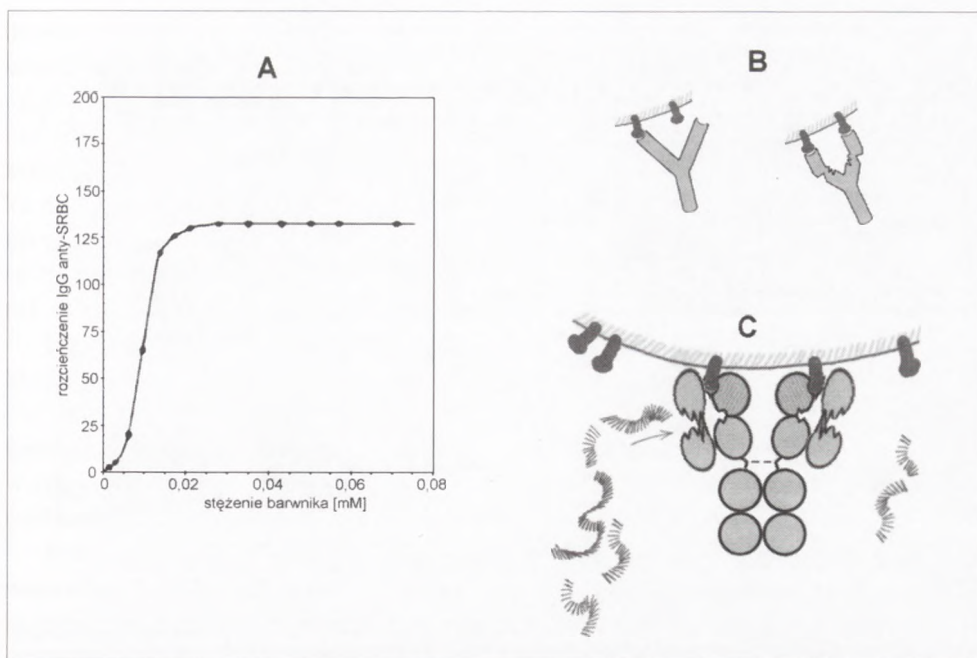
Ekspozycja powierzchni hydrofobowej i zaznaczona periodyczność struktury miceli taśmowej jest przyczyną ogólnej tendencji do oddziaływania z polimerami łańcuchowymi o odpowiednio niskiej polarności i strukturze periodycznej. Dzięki dużej powierzchni oddziaływania, kohezyjne przyłączenie do polimeru daje mocne kompleksy, tym bardziej, że micela taśmowa jest plastyczna i może dobrze dopasować



Rys. 6. Modelowe wyobrażenie mezofazy tworzonej przez supramolekularne struktury taśmowe: A – modelowy obraz mezofazy. W obwodzie fragment taśmy uzyskany z obliczeń; B – cząsteczka czerwieni Kongo i jej obraz w układzie CPK; C – fragment taśmy z interkalowaną obcą cząsteczką.

wać się do powierzchni akceptorowej (37). Warunki te są spełnione również w odniesieniu do kompleksowania taśmowych struktur micelarnych z łańcuchami polipeptydowymi o konformacji  $\beta$  w białkach, jednak tylko w sytuacji ich dostępności, co nie dotyczy natywnych, dobrze „upakowanych” białek (38,39). Łatwością penetracji można wytłumaczyć intensywne wiązanie czerwieni Kongo przez amyloidy uważane za niestabilne z natury białka  $\beta$ -strukturalne (40,41). Ligand supramolekularny może zastąpić w płycie  $\beta$  jeden odcinek peptydowy (42). Energia oddziaływania miceli taśmowej utworzonej z silnie zasocjowanych cząsteczek barwnika, wprowadzonej do płyty  $\beta$ -strukturalnej, jak się okazało, była porównywalna lub nawet większa od energii oddziaływania łańcucha peptydowego. Kompleks powstaje w warunkach destabilizacji całego białka, ale może też utworzyć się przy destabilizacji lokalnej, tzn. wówczas gdy ruchy dynamiczne jednego z łańcuchów tworzących płytę  $\beta$  stają się wystarczająco duże, aby umożliwić penetrację liganda do miejsca uwolnionego przez ruchomy peptyd. Trwałość powstałego kompleksu białko-ligand jest przyczyną przesunięcia równowagi w stronę jego tworzenia. Jakkolwiek natywne, szczególnie „upakowane” białko nie ma możliwości wiązania ligandu supramolekularnego, niektóre białka stają się dostępne dla penetracji ligandów ciekłokrystalicznych już w wyniku naprężeń i przegrupowań strukturalnych związanych z funkcją biologiczną (43-46). Wytworzenie kompleksu z micelą barwnika stabilizującego

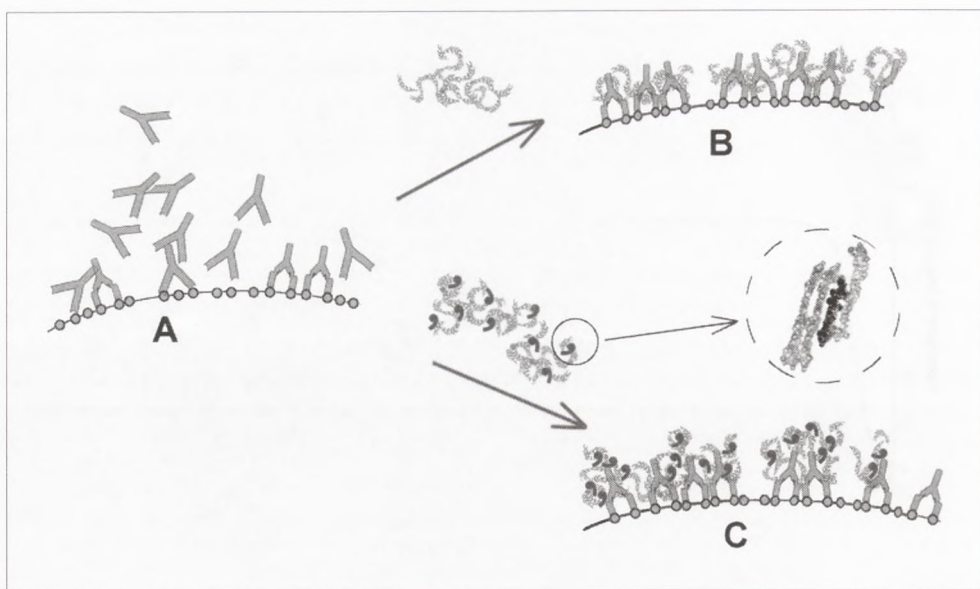




Rys. 7. Mechanizm wzmocnienia interakcji antygen-przeciwciała przez ligandy ciekłokrystaliczne: A – wzmocnienie wyrażone przez zwiększenie odczytywanego miana przeciwciał w układzie SRBC-antySRBC; B i C – prawdopodobny mechanizm wytwarzania naprężenia w cząsteczce immunoglobuliny i jej stabilizacji przez kompleksowanie miceli taśmowej.

białko w stanie transformacji strukturalnej, generowanej aktywnością biologiczną ma w konsekwencji wpływ na funkcję.

Do białek, które spełniają te warunki należą immunoglobuliny. Zmiany strukturalne przeciwciał, odpowiedzialne za wiązanie barwników ciekłokrystalicznych są generowane interakcją z antygenem. Fizjologicznie, stanowią one formę sygnalizacji, która jest odpowiedzialna za wyzwolenie aktywności efektorowej (np. aktywację układu dopełniacza) (47,48). Wytworzenie kompleksu ligandów supramolekularnych z przeciwciałem zmniejsza naprężenie w cząsteczce białka i w konsekwencji współdziała w tworzeniu połączenia z antygenem, a tym samym go wzmacnia. Ten niezwykle efekt działania taśmowych ligandów ciekłokrystalicznych odczytywany jako zwiększenie powinowactwa do antygenu (rys. 7) (43) umożliwił opracowanie założeń nowej techniki immunotargetingu (rys. 8) (49,50). Technika ta pozwala na bezpośrednie wykorzystanie nie modyfikowanych przeciwciał, związanych do antygenu jako wskaźnika celu. Jest to ukierunkowanie specyficzne, ponieważ jedynie przeciwciała związane do antygenu są zdolne do wytworzenia kompleksu z ligandem ciekłokrystalicznym. Wolne przeciwciała nie poddają się penetracji. Bardzo silne wzmocnienie interakcji przeciwciała z antygenem pod wpływem ligandów



Rys. 8. Ujęta modelowo zasada techniki „immunotargetingu” oparta na wykorzystaniu chromonicznych, ciekłokrystalicznych struktur nośnych: A – kompleks immunoglobuliny na powierzchni komórki; B – kompleks w obecności ligandów ciekłokrystalicznych; C – kompleks z przyłączonym nośnikiem i lekiem.

ciekłokrystalicznych jest cechą wysoce obiecującą wobec niezadowolających zwykle aktywności przeciwciał przeciwnowotworowych.

Istotną zaletą o znaczeniu praktycznym związków, które (jak obecnie wiemy) tworzą taśmowe struktury micelarne jest duża łatwość wydalenia ich z organizmu. Z tej przyczyny zarówno czerwień Kongo, jak i błękit Evansa, używane były do badania objętości krwi (51). Specyficzna taśmowa struktura supramolekularnej organizacji micelarnej (rys. 6 A) i jej charakter dynamiczny zwiększają płynność mezofazy. Usprawnia to doprowadzenie nośnika do komórek docelowych i jego związanie, podczas gdy nadmiar wraz z nośnikiem zostaje łatwo wydalony. Istnieje nadzieja, że dzięki temu możliwa będzie intensyfikacja terapii bez obawy retencji toksycznego preparatu w organizmie. Według wstępnych założeń techniki, nośnik wysyłany jest wraz z lekiem w ślad za podanymi wcześniej specyficznymi przeciwciałami. Lek wiązany jest w micelach nośnika na zasadzie interkalacji (rys. 6 C, 8 C), chociaż możliwe są też inne wersje przyłączania.

Zaletą techniki jest, jak wspomniano, możliwość stosowania przeciwciał bez potrzeby ich chemicznej modyfikacji, ale jednocześnie wadą jest konieczność użycia pełnej immunoglobuliny z fragmentem Fc. Taka tylko immunoglobulina podlega bowiem odpowiednio dużym naprężeniom przy tworzeniu kompleksów immunologicznych (52-54), jest zdolna do przenoszenia sygnału immunologicznego i wiązania



ligandu ciekłokrystalicznego wzmacniającego interakcję z antygenem. Może to wymusić, dla uzyskania odpowiedniego efektu, stosowanie humanizowanych, ale pełnych cząsteczek przeciwciał lub odwołanie się do technik „kamouflażu”. Wymóg wywoływania odpowiednio dużych naprężeń w cząsteczce przeciwciała dla tworzenia kompleksów z nośnikiem może być cechą korzystną. Ograniczy on bowiem wiązanie nośnika do kompleksów immunologicznych, tworzonych z wolno pływającymi antygenami nowotworowymi, które jako niezależne i ruchome mają znacznie mniejsze szanse na wytworzenie odpowiednich naprężeń w cząsteczce wiążącego je przeciwciała niż w przypadku, gdy dotyczy to determinant komórkowych.

Ligand ciekłokrystaliczny wraz z lekiem można też posłać docelowo w formie kompleksu z cieplnie agregowaną immunoglobuliną, która w tej formie intensywnie i w dużych ilościach wiąże czerwien Kongo, jak również inne supramolekularne ligandy i staje się dobrze rozpuszczalna (55). Kompleks taki można ukierunkować w sposób typowy przez uzbrojenie w humanizowane przeciwciała. Rozwiązanie to analizowane jest niezależnie.

Przewidywaną niedogodnością zastosowań taśmowych miceli jest też niewątpliwie odpowiedni wymóg dotyczący struktury leku, który w najprostszym wydaniu kompleksu wiązany jest z nośnikiem przez interkalację i dla większej stabilności połączenia powinien charakteryzować się planarnością cząsteczki, co zmniejsza możliwość wyboru. Obiekcje mogą wywołać również stwierdzone pewne właściwości rakotwórcze czerwieni Kongo, powodowane możliwością redukcji barwnika przez bakterie jelitowe, z wydzieleniem benzydyny. Podawanie dożylnie eliminuje praktycznie to zagrożenie. Niezależnie jednak prowadzone są badania mające na celu zamianę wiązań azowych na inne nieredukowalne połączenia oraz zastąpienie benzydyny nierakotwórczą pochodną.

Pomimo dostrzeganych wad i niedogodności zalety opisywanego nośnika ciekłokrystalicznego, jak się wydaje, są na tyle istotne, że w ich świetle opłacalne stają się poszukiwania możliwości optymalizacji metody.

#### 4. Podsumowanie

Terapia celowana, jak się wydaje, jest absolutnym wymogiem, jeśli ma nastąpić istotny postęp w farmakoterapii nowotworów, niezależnie od rodzaju oddziaływania terapeutycznego. Zainteresowanie technikami celowanego podawania leku jest zatem olbrzymie. Niestety na drodze realizacji tego celu piętrzą się trudności. Są one związane z niedoskonałością nośników przewidywanych do transportu leków jak i obcością przeciwciał stosowanych dla jego ukierunkowania. W artykule przedstawiono zwięźle związane z tym problemy, niektóre rozwiązania i podejmowane próby udoskonaleń. Jako nową omówiono technikę wykorzystania chromonicznych układów ciekłokrystalicznych, tworzących taśmowe struktury micelarne. Przedstawiono zalety i przewidywane wady tego nośnika. Supramolekularna struktura nośni-



ka powstaje w procesie samoasocjacji ze sztywnych, wydłużonych, symetrycznych, raczej płaskich cząsteczek z silnie zaznaczonymi ugrupowaniami polarnymi rozmieszczonymi biegunowo. Zasocjowane cząsteczki tworzą micelarne struktury taśmowe. Cechują się one specyficzną zdolnością wiązania się z kompleksami immunologicznymi. Micele taśmowe mogą przyłączać i transportować wiele substancji, szczególnie cechujących się planarnością, przez interkalację, podobnie jak czynią to kwasy nukleinowe. Najłatwiej dostępne micelarne struktury taśmowe tego rodzaju tworzone są przez barwniki tzw. bezpośrednie, należące do grupy związków bisazowych, w tym czerwień Kongo, błękit Evansa i wiele innych. Związki te znane są od dawna jako barwniki celulozy i amyloidów, ale ich supramolekularna struktura, jak również zdolność do reagowania z przeciwciałami i wynikające stąd możliwości wykorzystania praktycznego są nowością. Jedną ze szczególnych cech supramolekularnych struktur tworzonych przez tego typu związki, jest zdolność silnego wzmacniania interakcji antygenu z przeciwciałami. Ta odkryta niedawno cecha wyróżnia nośniki taśmowe i, jak się wydaje, jest szczególnie obiecująca dla rozpoznawania komórek nowotworowych. Specyficzna, supramolekularna struktura tych związków i ich polarność utrudnia, według dotychczasowych badań, wiązanie się do komórek z wyjątkiem tych, na których umiejscowione są kompleksy immunologiczne. W pracy przedstawiono prawdopodobny mechanizm wiązania ligandów supramolekularnych do przeciwciał oraz przewidywane wady i zalety tego typu związków jako nośników w terapii celowanej.

Badania prezentowane w publikacji finansowane są przez KBN (grant numer 4 PO5F 039 14).  
Graficzne opracowanie – Romuald Bolesławski.

## Literatura

1. Marx J., (2000), *Science*, 289, 1670-1672.
2. Cairns P., Sidransky D., (1999), *BBA*, 1423, C11-C18.
3. Plautz G. E., Mukai S., Cohen P. A., Shu S., (2000), *J. Immunol.*, 165, 3656-3662.
4. Hiltbold E. M., Vlad A. M., Ciborowski P., Watkins S. C., Finn O. J., (2000), *J. Immunol.*, 165, 3730-3741.
5. Schmielau J., Schmiegel W., (1999), *Antibodies in Diagnosis and Therapy – Technologies, Mechanisms and Clinical Data*, Eds. Matzku S., Stahel R. A., Harwood Academic Publishers, 159-202.
6. Hickman J. A., Dive C., (1999), *Apoptosis and cancer chemotherapy*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
7. Ghetie M-A., Podar E. M., Ilgen A., Gordon B. E., Uhr J. W., Vitetta E. S., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 7509-7514.
8. Segal D. M., Vance B. A., Sconocchia G., (1999), *Antibodies in Diagnosis and Therapy – Technologies, Mechanisms and Clinical Data*, Eds. Matzku S., Stahel R. A., Harwood Academic Publishers, 49-80.
9. Mack M., Riethmüller G., Kufer P., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7021-7025.
10. Bobrzecka K., Konieczny L., Laidler P., Rybarska J., (1980), *Immunol. Letters*, 2, 151-155.



11. Konieczny L., Bobrzecka K., Laidler P., Rybarska J., (1981), *Haematologia*, 14, 95-99.
12. Crasto C., Feng J., (2000), *Protein Engineering*, 13, 309-312.
13. Sun L. K., Curtis P., Rakowicz-Szulczyńska E., Ghayeb J., Chang N., Morrison S. L., Koprowski H., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 214-218.
14. Holliger P., Prospero T., Winter G., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6444-6448.
15. Zuo Z., Jimenez X., Witte L., Zhu Z., (2000), *Protein Engineering*, 13, 361-367.
16. Zapata G., Ridgway J. B. B., Mordenti J., Osaka G., Wong W. L. T., Bennett G. L., Carter P., (1995), *Protein Engineering*, 8, 1057-1062.
17. Little M., Kipriyanov S. M., (1999), *Antibodies in Diagnosis and Therapy – Technologies, Mechanisms and Clinical Data*, Eds. Matzku S., Stahel R. A., Harwood Academic Publishers, 1-48.
18. Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G., (1988), *Nature*, 332, 323-327.
19. Roguska M. A., Pedersen J. T., Henry A. H., Searle S. M. J., Roja C. M., Avery B., Hoffee M., Cook S., Lambert J. M., Blättler W. A., Rees A. R., Guild B. C., (1996), *Protein Engineering*, 9, 895-904.
20. Co M. S., Deschamps M., Whitley R. J., Queen C., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2869-2873.
21. Roguska M. A., Pedersen J. T., Keddy C. A., Henry A. H., Searle S. J., Lambert J. M., Goldmacher V. S., Blättler W. A., Rees A. R., Guild B. C., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 969-973.
22. Scott M. D., Murad K. L., Koumpouras F., Talbot M., Eaton J. W., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7566-7571.
23. Studnicka G. M., Soares S., Better M., Williams R. E., Nadell R., Horwitz A. H., (1994), *Protein Engineering*, 7, 805-814.
24. Tersikh A. V., Le Doussal J.-M., Crameri R., Fisch I., Mach J.-P., Kajava A. V., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 1663-1668.
25. Delaloye A. B., (1999), *Antibodies in Diagnosis and Therapy – Technologies, Mechanisms and Clinical Data*, Eds. Matzku S., Stahel R. A., Harwood Academic Publishers, 135-158.
26. Zangemeister-Wittke U., Wels W., (1999), *Antibodies in Diagnosis and Therapy – Technologies, Mechanisms and Clinical Data*, Eds. Matzku S., Stahel R. A., Harwood Academic Publishers, 81-114.
27. Sharma A., Sharma U. S., (1997), *Int. J. Pharmaceutics*, 154, 123-140.
28. Park J. W., Hong K., Kirpotin D. B., Papahadjopoulos D., Benz C. C., (1997), *Adv. Pharmacol.*, 40, 399-435.
29. Huwyler J., Wu D., Pardridge W. M., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14164-14169.
30. Kwon G. S., Naito M., Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K., (1995), *Pharmaceutical Res.*, 12, 192-195.
31. Kwon G. S., Kataoka K., (1995), *Adv. Drug Delivery Reviews*, 16, 295-309.
32. Attwood T. K., Lydon J. E., Hall C., Tiddy G. I. T., (1990), *Liquid Crystals*, 7, 657-668.
33. Wasilevskaia A. C., Generalova E. W., Sonin A. C., (1989), *Uspiechi chimi (in Russian)* LVIII, 1575-1596.
34. Skowronek M., Stopa B., Konieczny L., Rybarska J., Piekarska B., Szneler E., Bakalarski G., Roterman I., (1998), *Biopolymers*, 46, 267-281.
35. Skowronek M., Roterman I., Konieczny L., Stopa B., Rybarska J., Piekarska B., Górecki A., Król M., (2000), *Computers and Chemistry*, 24, 429-450.
36. Skowronek M., Roterman I., Konieczny L., Stopa B., Rybarska J., Piekarska B., (2000), *J. Computational Chemistry*, 21, 656-667.
37. Konieczny L., Piekarska B., Roterman I., Rybarska J., Skowronek M., Stopa B., (1996), *Wiadomości Chemiczne*, 50, 29-42.
38. Roterman I., Konieczny L., Stopa B., Rybarska J., Piekarska B., (1994), *Folia Biologica (Kraków)*, 42, 115-128.
39. Piekarska B., Skowronek M., Rybarska J., Stopa B., Roterman I., Konieczny L., (1996), *Biochimie*, 78, 183-189.
40. Raffin R., Dieckman L. J., Szpunar M., Wunschl C., Pokkuluri P. R., Dave P., Stevens P. W., Cai X., Schiffer M., Stevens F. J., (1999), *Protein Sci.*, 8, 509-517.
41. Bellotti V., Mangione P., Merlini G., (2000), *J. Struct. Biol.*, 130, 280-289.
42. Roterman I., Rybarska J., Konieczny L., Skowronek M., Stopa B., Piekarska B., (1998), *Computers and Chemistry*, 22, 61-70.

43. Rybarska J., Konieczny L., Roterman I., Piekarska B., (1991), *Archiv. Immunol. Therapie Exper.*, 39, 317-327.
44. Roterman I., No K-T., Piekarska B., Kaszuba J., Pawlicki R., Rybarska J., Konieczny L., (1993), *J. Physiol. Pharmacol.*, 44, 213-232.
45. Stopa B., Konieczny L., Piekarska B., Roterman I., Skowronek M., (1997), *Biochimie*, 79, 23-26.
46. Stopa B., Górny M., Konieczny L., Piekarska B., Rybarska J., Skowronek M., Roterman I., (1998), *Biochimie*, 80, 963-968.
47. Zavodsky P., Kilar F., Torok J., Megdyesi G. A., (1983), *Protein Conformation as an Immunological Signal*, Eds. Celada F., Schumaker V. N., Sercarz E. E., Plenum Press, New York, London, 15-29.
48. Piekarska B., Rybarska J., Stopa B., Zemanek G., Król M., Roterman I., Konieczny L. (1999), *Acta Biochimica Polonica*, 46, 841-851.
49. Konieczny L., Piekarska B., Rybarska J., Stopa B., Krzykwa B., Noworolski J., Pawlicki R., Roterman I., (1994), *J. Physiol. Pharmacol.*, 45, 441-454.
50. Konieczny L., Piekarska B., Rybarska J., Skowronek M., Stopa B., Dąbroś W., Pawlicki R., Roterman I., (1997), *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 35, 203-210.
51. Brown M. A., Mitar D. A., Whitworth J. A., (1992), *Clinical Science*, 45, 147-162.
52. Pilz I., Kratky O., Licht A., Sela M., (1975), *Biochemistry*, 14, 1326-1333.
53. Jaton J-C., Huser H., Braun D. G., Givol D., Pecht I., Schlessinger J., (1975), *Biochemistry*, 14, 5312-5315.
54. Kaszuba J., Konieczny L., Piekarska B., Roterman I., Rybarska J., (1993), *J. Physiol. Pharmacol.*, 44, 233-242.
55. Rybarska J., Piekarska B., Konieczny L., Roterman I., (1988), *Archiv. Immunol. Therapie Experiment.*, 36, 609-622.